

Helsinki 14.05.99

CT/F 99/00347

09/674034

ETUOIKEUSTODISTUS
P R I O R I T Y D O C U M E N T

RECD 16 JUN 1999

INFO

FOF



Hakija
Applicant

SAVOLAINEN, Jouko
Espoo

Patentihakemus nro
Patent application no

980945

Tekemispäivä
Filing date

29.04.98

Kansainvälinen luokka
International class

A 23L

Keksinnön nimitys
Title of invention

"Menetelmä proteiinien eristämiseksi ja muuntelemiseksi"

Täten todistetaan, että oheiset asiakirjat ovat tarkkoja jäljennöksiä patentti- ja rekisterihallitukselle alkuaan annetuista selityksestä, patenttivaatimuksista ja tiivistelmästä.

This is to certify that the annexed documents are true copies of the description, claims and abstract originally filed with the Finnish Patent Office.

Pirjo Kaila
Tutkimussihteeri

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Maksu 270,- mk
Fee 270,- FIM

Osoite: Arkadiankatu 6 A
Address: P.O.Box 1160
FIN-00101 Helsinki, FINLAND

Puhelin: 09 6939 500
Telephone: + 358 9 6939 500

Telefax: 09 6939 5204
Telefax: + 358 9 6939 5204

Menetelmä proteiinien eristämiseksi ja muuntemiseksi

Keksintö koskee menetelmää proteiinien eristämiseksi, erityisesti herasta tai soijasta ja eristettyjen proteiinien muuntemiseksi, saattamalla proteiinit, erityisesti hera tai soija tai sen konsentraatti, kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi.

Heraproteiinit ovat muihin proteiineihin nähden ravintoarvoltaan ylivoimaisia erityisesti lysiini- ja metioniinipitoisuutensa vuoksi. Heraproteiinien jalostus ihmislavinaksi ja terveysvaikutteisiksi ravintotuotteiksi nostaisi heran jalostusarvoa ja lisäisi näin juustontuotannon kannattavuutta. Vaikka heraproteiinilla on hyvät käyttöedellytykset elintarvikeraaka-aineena, suurimpina esteinä sen käytölle ovat talteenottoprosessien ja fraktioiden eristysprosessien kalleus sekä proteiinikonsentraattien ja isolaattien vaihtelevat ja heikot toiminnalliset ominaisuudet, kuten huono liukoisuus, emulgoituvuus, geeliytyvyys ja vaahtoutuvuus.

Heran proteiinien eristämistä vaikeuttaa niiden hyvä liukoisuus, eikä siihen voida vaikuttaa pH:n muutoksella välillä pH 2-9 proteiinien ollessa natiivissa muodossa. Proteiineja voidaan eristää neljän päämenetelmän mukaisesti: 1. denatuointi kuumentamalla ja saostus, 2. ultrasuodatus, 3. ioninvaihto ja 4. kemiallinen muuntelu ja saostus.

Yleisimmin tunnettu menetelmä heraproteiinien eristämiseksi on kuumennusdenatuointi ja pH:n laskeminen happamalle puolelle. Tällä menetelmällä saadaan proteiini, joka on menettänyt lähes kaikki tärkeimmistä toiminnallisista ominaisuuksistaan. Sitä käytetään pääasiassa erilaisissa levitteissä, esimerkiksi sulatejuustoissa, osittain tai kokonaan korvaamaan juusto (Hill et al., Can. Int. Food Sci. Technol. J. 15 (1982), 155-160).

Nykyään heran proteiinit eristetään pääasiassa proteiinikonsentraattina käyttämällä ultrasuodatusta ja kuivausta tai proteiini-isolaattina käyttämällä ioninvaihtoadsorptiotekniikkaa ja kuivausta. Molemmilla menetelmillä on mahdollista saada eristetyt proteiinit toiminnallisina. Määrävänenä tekijänä näiden tuotantomenetelmien valinnassa on saavutettava tuotteen toiminnalisuus ja tuotantokustannukset.

Edellä mainituilla menetelmillä aikaansaatujen proteiinikonsentraattien koostumukseissa, toiminnallisudessa sekä aistittavissa ominaisuuksissa esiintyy kuitenkin

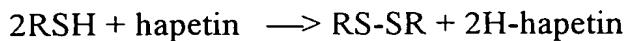
suurta vaihtelua ja sen vuoksi teollisuus vieroksuu niiden käyttöä. Vaihtelu johtuu käytettävän heran erilaisesta koostumuksesta ja esikäsittelyn sekä valmistus- ja kä-
sittelyolosuhteiden erilaisuudesta.

5 Proteiini-isolaateissakin esiintyy edellä mainituista syistä eri ominaisuuksien vaihte-
lua. Niiden valmistuksessa käytetty ioninvaihtoadsorptiomenetelmä tasaa vaihtelua
jonkin verran ja antaa koostumukseltaan erilaisen lopputuotteen kuin ultrasuodatuks-
ella tuotettu proteiinikonsenraatti on. On havaittu, että isolaatit ovat selvästi laa-
10 dukkaampia ja toiminnallisempia kuin konsenraatit proteiinin ja rasvan määrän
suhteen sekä proteiinin liukoisuuden, vaahtoavuuden ja vaahdon pysyvyyden, pro-
teiinin denaturoimattomuuden ja kokkareisuuden sekä maun ja hajun suhteen. Kon-
senraattien suhteellisen korkea laktoosi- ja mineraalipitoisuus sekä heikko maku ja
haju ovat tekijöitä, jotka rajoittavat konsenraattien käyttöä elintarviketeollisuudessa.
15 Heraproteiini-isolaattien käyttökelpoisuutta rajoittaa hyvistä ominaisuuksista huoli-
matta valmistusmenetelmästä johtuva tuotteen korkea hinta.

Tunnettua on myös, että muuttamalla proteiinien rakennetta kemiallisella reaktiolla
voidaan vaikuttaa molekyylin avaruusrakenteeseen/konformaatioon, varaukseen ja
hydrofobisuuteen sekä siten proteiinin eräisiin muihinkin ominaisuuksiin, kuten liu-
20 koisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja emulgoituvuuteen.

Käytännöllisin ja yksinkertaisin kemiallinen menetelmä proteiinin molekyylin ra-
kenteen muuntelussa on sulfonointi, tarkemmin tiolisulfonointi eli S-sulfonointi, jo-
ka saadaan aikaan oksidatiivisella sulfitolyyssillä. Siinä proteiinien aminohappoketju-
25jen väliset rikkisillat eli disulfidisidokset aukaistaan, mikä saadaan aikaan lisäämällä
sulfitti-ioneja, jolloin käynnistyy hapetuspelkistysreaktio, jossa toinen rikki hapet-
tuu sulfonaatiksi ja toinen pelkistyy sulphydryyliryhmäksi.

30 Lisäämällä mukaan vielä hapettava tekijä hapettuvat vapaat sulphydryyliryhmät jäl-
leen disulfidisidoksiksi, jotka puolestaan jatkavat reaktiossa niin kauan, kunnes
kaikki sulphydryyliryhmät ovat sulfonituneet tai reaktion jokin muu tekijä on muo-
dostunut rajoittavaksi. Oksidatiivisen sulfitolyyzin periaate on kuvattu seuraavilla
yhtälöillä:



Siinä RS-SR kuvaaa proteiinimolekyyliä, joka koostuu kahdesta aminohappoketjusta R, jolloin S-S on kahden aminohappoketjun välissä oleva disulfidisidos. Se yhdistää aminohappoketjut ja pitää niitä osaltaan lukittuna tiettyyn asentoon. Muunnellut 10 proteiinimolekyylit ovat saostettavissa liuoksesta laskemalla pH:ta sulfitolyysireaktion pH:sta pH 3-5:een.

Oksidatiivista sulfitolyysiä on julkaisussa Kella, N. K. D. et al., J. Agr. Food Chem. 37, (1989), 1203-1210, käytetty heran proteiini-isolaattien molekyylien muunteluun 15 tarkoituksesta vaikuttaa proteiinien toiminnallisiin ominaisuuksiin, kuten liukoisuuteen, viskositeettiin, vaahtoavuuteen ja vaahdon pysyvyyteen. Ominaisuuksiin vaikuttavana tekijänä oli disulfidisidosten vähentäminen suhteessa alkuperäisten disulfidisidosten määrään. Tietyt ominaisuudet paranivat tai huononivat disulfidisidosten määrään vähetessä. Mm. liukoisuus huononi alle 5 %:n jo 25 %:n disulfidisidoksista 20 avauduttua ja samalla liukoisuus-pH-käyrän liukoisuusminimi muuttui.

Muuntelureaktiossa proteiini-isolaattien konsentraatio oli 1,0 % ja sulfiitin 0,1 M, urean 4 M sekä pH 7,0 ja lämpötila 25 °C. Hapettimena käytettiin liuoksen läpi puhallettua happea ja katalysaattorina CuSO₄:a liuotettuna 800 mM konsentraatioon. 25 Eriasteisesti muunnellut proteiini-isolaatit eristettiin saostamalla ammoniumsulfatilla, jota lisättiin liuokseen niin paljon, että siitä muodostui 50-prosenttisesti kyllästetty. Muuttuneita liukoisuusominaisuuksia ei käytetty hyväksi proteiinien eristämissessä.

30 Julkaisussa Gonzalez, J. M., Damodaran, S., J. Food Sci., 55 (1990), no 6, 1559-1563, käytettiin oksidatiivista sulfitolyysiä tarkoituksesta eristää sellaisen makean raakaheran proteiineja, jonka proteiinipitoisuus oli noin 0,6 %, lähes samoissa koeoloosuhteissa kuin edellä; pH 7,0, sulfiittikonsentraatio 0,1 M, lämpötila 25 °C sekä hapettimena happy ja katalysaattorina Cu²⁺-ioni CuCO₃:na, mutta tässä tapauksessa 35 kiinteinä helminä ja pakattuna lasikoloniin. Sulfitolyysin tuote hapetettiin sulfo-naattijohdannaiseksi kierrättämällä sitä mainituilla helmillä täytetyssä kolonnissa. Sen jälkeen helmien jäännökset poistettiin nestemäisestä reaktioseoksesta sentrifugimalla. Tekijät osoittivat, että pelkällä sulfitolyysillä eli 0,1 M:n sulfiittilisäyksin

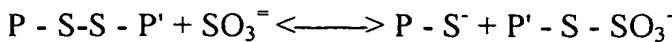
jälkeen edellä kuvatuissa olosuhteissa vain noin 0,4 moolia disulfidi- ja sulfhydryyliyhmiä 43000 grammamoolia proteiinia kohti sulfonoitui 30 minuutissa, ja senkin oletettiin johtuneen heran luontaisesta hapetuskyvystä. Vastaavissa olosuhteissa hapetettaessa hapella katalysaattorin avulla noin 1,5 moolia disulfidi- ja sulfhydryyliyhmiä sulfonoitui 3 minuutissa ja noin 2,3 moolia 30 minuutissa. Sulfonoidut ja kuparin kanssa kelatoituneet proteiinit eristettiin toiminnallisina saostamalla pH:ssa 4,5. Ennen saostamista liuoksesta jouduttiin kuitenkin poistamaan sulfonoitun heran proteiiniin kelatoitunut kupari EDTA-käsittelyllä.

10 Tässä oli kysymyksessä monimutkainen laboratoriomittakaavan toteutus konsentroimattomalla heraproteiinilla. Siinä ei voitu hyödyntää korotetun lämpötilan reaktiota nopeuttavaa vaikutusta, koska hapen liukoisuus ja siten sen pitoisuus liuokseissa pienenee niin, että se on reaktiota rajoittava tekijä. Lisäksi elektrolyytien runsas mukanaolo vielä rajoittaa hapen liukoisuutta ja siten myös happipitoisuutta.

15 Oksidatiivista sulfitolyysiä (Kella, N. K. D., et al., J. Agr. Food Chem., 37 (1989), 1203-1210) on käytetty soijaproteiinien, esimerkiksi glyysiinin, jaotteluun/fraktiointiin pienemmiksi alayksiköiksi. Glyysiini koostuu useasta alayksiköstä, jotka ovat puolestaan muodostuneet kahdesta polypeptidistä. Polypeptidit ovat kiinnittyneet toisiinsa yhdellä disulfidisidoksella, joten aukaisemalla disulfidisidoksia oksidatiivisella sulfitolyysillä proteiini on jaoteltavissa pienempiin osiin, mikä vaikuttaa puolestaan toiminnallisiin ominaisuuksiin mm. emulgoituvuuteen, geeliytyvyyteen ja vaahdotuvuuteen kuten Petracelli, S. ja Anón, M. C., J. Agric. Food Chem., 43 (1995), 2001-2006, ovat osoittaneet.

20 25 Sulfitolyysiä on myös käytetty soijan biologisesti aktiivisen proteiinin, trypsiini-inhibiitorin rakenteen/konformaation muunteluun siten, että ihmisen ruoansulatukselle haitallisen proteiinin aktiivisuus katoaa. Trypsiini-inhibiittori on inaktivoitavissa kuumentamalla, mutta 1 tunnin kuumennus 75 °C:ssa tai 10 min kuumennus 100 °C:ssa inaktivoi inhibiitorista vain noin 80 %. Kuumennuksen jatkaminen aiheuttaa proteiinin ravintoarvon alentumista. Kuumentamalla yhden tunnin ajan soijajauhoa 700 g 2,1 litrassa 0,5 M Tris-puskuria pH 8,5, jossa on Na₂SO₃:a 4,78 g (0,03 moolia), trypsiini-inhibiitorin aktiivisuus hävisi kokonaan. Jäännössulfiitin poistamiseen käytettiin dialysointia, joka kesti 3 päivää. Vaihtoehdoksi sulfiitin poistoon suositeltiin proteiinien saostamista isoelektrisessä pisteessä, pH 4,5:ssä, jota käytetään saostukseen soijaisolaatin teollisessa valmistuksessa. Toimenpiteessä hyödynnetään jäljempänä esitetyssä reaktiossa vapautuneen sulfiitin pesemistä pois proteiinin eristyksen yhteydessä.

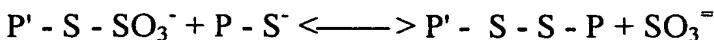
Trypsiini-inhibiittorin rakenteen/konformaation muuntelun selitettiin perustuvan sulfiitin aiheuttamaan disulfidiryhmän avautumiseen seuraavan kaavan mukaan:



5

Sen jälkeen muodostunut S-sulfonaatti reagoi toisen sulfhydryyliryhmän kanssa, joka on jo ollut olemassa tai muodostunut samassa sulfitolyyssä ja muodostaa sen kanssa uuden disulfidiryhmän eri paikkaan proteiinimolekyyliissä. Samalla vapautuu S-sulfonaattiryhmästä sulfiittia seuraavan kaavan mukaan:

10



Kokonaisvaikutus on uuden disulfidiryhmän muodostuminen ja lähes kaiken sulfiitin vapautuminen (Friedman, M. ja Gumbmann, M. R., J. Food Sci. 51 (1986), 15 1239-1241).

20

Edellä esitettyt sovellutukset, jotka perustuvat oksidatiiviselle sulfitolyyksille, eivät joko pyrkineet tarjoamaan ratkaisua eristämiselle, vaan ainoastaan tiettyjen ominaisuuksien muunteluun hera- ja soijaproteiineilla, tai esitetty ratkaisu on niin vaikeasti hyödynnettävässä tuotantomitassa, ettei se ole ollut toteuttamiskelpoinen. Sama koskee sulfitolyyzin käyttöä biologisesti aktiivisten proteiinien inaktivointiin ja molekyylirakenteen muunteluun soijalla.

25

FI-patentissa 96266 "Menetelmä heraproteiinien eristämiseksi" ja FI-patentihakemuksessa 944110 "Menetelmä ja laite heraproteiinien eristämiseksi" on kehitetty menetelmä ja prosessi, jossa on pyritty mahdollisimman yksinkertaiseen, toimivaan ja taloudelliseen heran proteiinien eristämiseen ja fraktiointiin ja tuottamaan mahdollisimman toiminnallisia proteiineja, joilla on toiminnallisina ominaisuuksina mm. emulgoituvuus, geeliytyvyys ja vaahtoutuvuus. Tuotteet on tarkoitettu tasoltaan ihmislähetystöön käytettäviksi.

30

Edellä mainitussa suomalaisessa keksinnössä heraproteiinit käytetään 4-16 kertaa konsentroituna, jolloin niiden proteiinipitoisuus on 2-7 paino/tilavuus-%. Oksidatiivinen sulfitolyyysi suoritetaan lisäämällä heraproteiinikonsentraattiin sulfiittia sellainen määrä, jolla voidaan säädellä aukaistujen ja sulfonoidujen disulfidisidosten suhdetta disulfidisidosten alkuperäiseen määrään.

Hapetus suoritetaan sulfitolyysin jälkeen sopivalla elintarvikekäyttöön kelpaavalla ja hallittavalla kemiallisella yhdisteellä esimerkiksi CaO_2 :lla, jolloin vältetään hankala hapen ja katalysaattorin käyttö ja siihen liittyvät rajoitukset. Reaktiolämpötilana käytetään 30-55 °C ja reaktio-pH:na 5,0-8,5.

5

Sulfonoidut heraproteiinit ovat saostettavissa alentamalla pH:ta 2,5-5,5:een. Alentamalla pH:ta eri pH-tasoille voidaan heraproteiinista saostaa koostumukseltaan erilaisia fraktioita, joissa on heran pääproteiineja α -laktalbumiinia, BSA:ta (naudan seerumialbumiinia) ja β -laktoglobuliinia eri suhteissa.

10

Happamessa, saostuksen yhteydessä vapautuvat oksidatiivisessa sulfitolyysissä muodostuneet S-sulfoniryhmät sekä jäljellä oleva sulfiitti muutetaan rikkidioksidiksi, joka puhalletaan pois sopivalla steriilillä kaasulla ja otetaan neutraloimalla talteen uudelleenkäyttöä varten.

15

Saostettu proteiinifraktio erotetaan mikrosuodattamalla sekä konsentroidaan ja pestään ultrasuodattamalla. Tuloksena on proteiinifraktiokonsentraatti, jossa on tietty proteiini-, laktoosi- ja suolapitoisuus. Liukoisena fraktion proteiinit konsentroidaan ja pestään ultrasuodattamalla, minkä tuloksena saadaan halutunlainen proteiinifraktiokonsentraatti.

20

Vaikka edellä esitetyissä suomalaisissa keksinnöissä heraproteiinien eristys erilaisina fraktioina yksinkertaistui ja eristys ensimmäistä kertaa toteutettiin aiempaa suuremmassa mittakaavassa ja sen taloudellinen toteuttaminen oli mahdollista, koko eristysprosessissa on vielä monta vaihetta, jotka pidentävät prosessiaikaa ja monimutkaistavat käsittelyä aiheuttaen kustannuksia.

25

Esillä olevan keksinnön tarkoituksena on yksinkertaistaa proteiinien, erityisesti hera- ja soijaproteiinien sekä eräiden muiden proteiinien sulfonoimalla tapahtuvaan muuntelua ja nopeuttaa fraktiointitapahtumaa sekä fraktioiden jatkokäsittelyä. Tämä on saatu aikaan siten kuin on esitetty oheisissa patenttivaatimuksissa.

30

Esillä olevassa keksinnössä on oivallettu, että proteiinien, kuten hera- tai soijaproteiinien, muuntelussa sulfitolyysi yksistään aiheuttaa jo riittävän disulfidisidosten aukeamisen eikä hapetus ole välttämätön proteiinimolekyylin konformaation muuttamiseksi ja proteiinien saostamiseksi happamissa olosuhteissa. Hapetuksen poisjääminen yksinkertaistaa ja nopeuttaa prosessia ja parantaa sen kannattavuutta. Käytämällä heraproteiinien sulfitolyysin reaktiolämpötilana noin 40-65 °C reaktio no-

peutuu ja reaktiotasapaino siirtyy sulfonointujen tuotteiden puolelle, jolloin tarvittavan sulfiitin määrä pienenee.

Seuraavassa keksintöä kuvataan sovellettuna heraproteiinin muunteluun ja eristämiseen, mutta keksinnön mukainen menetelmä soveltuu käytettäväksi myös muiden proteiinien, kuten soijaproteiinin, käsittelyyn.

Keksinnön mukaisessa menetelmässä käytetään taloudellisista syistä mahdollisimman korkean proteiinipitoisuuden omaavaa heraproteiinikonsentraattia. Edullisimman on osoittautunut noin 16-20-kertaa alkuperäiseen heraan nähdien konsentroitu heraproteiini. Sen proteiinipitoisuus on 9-12 paino-%.

Keksinnön mukaisesti hera- tai soijaproteiinien muuntelu, disulfidisidosten avaamisen ja konformaation muuntelu saadaan aikaan sulfityylihmäksi. Käytökkelpoisimpia sulfiitteja ovat liukoiset ja elintarvikelaatuiset natriumsulfiitti, natriumvetysulfiitti sekä natriummetabisulfiitti, mutta myös muita voidaan käyttää. Kaikista edellä nimeltä mainituista muodostuu reaktio-olosuhteissa valtaosaltaan natrium- ja natriumvetysulfiittia. Lopputuotteiden toiminnallisiin ja muihin ominaisuuksiin pystytään vaihtamaan valmistusprosessin sulfityylihmä määrittelemällä sulfiitin määrän suhde proteiinissa olevien disulfidisidosten määrään. Heraproteiinien sulfityylihmässä sopiva sulfiitin määrä on välillä 0,02-0,20 M, edullisesti 0,05-0,10 M.

pH:hon perustuvan saostuksen kannalta sulfityylihmä sulfonoidut hera- tai soijaproteiinit eivät tarvitse hapetusta ja siten sulfonoinnin jatkaminen niin, että kaikki sulfityylihmä vapautuneet sulfhydryyliryhmät sulfonointuisivat, ei ole tarpeen. Oksidatiivinen sulfityylihmä eli sulfityylihmä ja hapetus on käytökkelpoinen menetelmä silloin, kun tilanne ja olosuhteet vaativat aukaistujen disulfidisidosten molempien rikkiatomien sulfonointia.

Keksinnön mukaisen menetelmän optimoimiseksi on määriteltävä myös sopiva reaktiolämpötila, pH, saostuksissa käytetyt pH:t, pH:n muutoksissa käytetyt hapot ja emäkset, muut reagenssit sekä sopivat toimenpiteet ja menetelmät haluttujen ominaisuuksien saamiseksi tuotteille, jotka voivat olla proteiinikonsentraatteja tai suihkekuivattuja jauheita.

Keksinnön erään edullisen suoritusmuodon mukaan sulfitolyysin lämpötila on 40-65 °C. Sulfitolyysi tapahtuu pH:ssa 5,5-8,0, edullisesti 6,0-7,0. Reaktioaika on 10-50 min, edullisesti 20-40 min.

5 Edellä mainituilla tekijöillä pystytään vaikuttamaan muunneltujen proteiinien ja fraktioiden toiminnallisiin ominaisuuksiin sekä saostus-pH:lla fraktioiden määrään ja koostumukseen α -laktalbumiiniin, BSA:han ja β -laktoglobuliiniin nähden.

10 Keksinnön mukaisessa menetelmässä suoritetaan ensin heraproteiinikonsentraatin proteiinien muuntelu sulfitolyysillä ja sen jälkeen heraproteiinien tietyn osan saostus happamassa pH:ssa. Saostus suoritetaan pH:ssa 1,5-5,5 ja edullisesti pH:ssa 4,0-5,0 ja lämpötilan ollessa tarpeeksi korkea, edullisesti 40-65 °C, edullisimmin välillä 50-60 °C.

15 Sulfolyysillä muunnellut proteiinit voidaan jättää saostamattakin, jolloin saadaan eri asteisesti muunneltuja heran kokonaisproteiineja, joiden proteiinikoostumus on sama kuin herakonsentraatin alkuperäinen koostumus, mutta sen toiminnalliset ominaisuudet ovat muuttuneet muunteluasteesta riippuen.

20 Saostuksessa tai erikseen suoritettavassa toimenpiteessä pH:n ollessa selvästi happamen puolella, pH 1,5-4,5, sulfitolyysisä muodostuneet sulfoniryhmät ja sulfitolyysisä jäljelle jäänyt sulfiitti vapautuvat rikkidioksidina ja se johdetaan puhaltamalla steriilillä kaasulla, edullisesti ilmalla tai sen typpiseoksella, vastaanottosäiliöön, jossa se otetaan talteen natrium- ja natriumvetysulfiitin seoksena ja on käytetävissä seuraavassa sulfitolyysisä. Vapautunut rikkidioksiidi voidaan siis käyttää uudelleen, mikä säästää kyseistä raaka-ainetta eikä prosessi rasita ympäristöä rikkidioksidipäästöillä.

25 Fraktioimattomaksi jätettävän heraproteiininkin pH lasketaan happamen puolelle arvoihin, jossa saadaan vapautetuksi sulfoniryhmät ja jäljelle jäänyt sulfiitti rikkidioksidina, joka puhalletaan edellä kuvatulla tavalla.

30 Haluttaessa saostuksen jälkeen voidaan toteuttaa fraktointi, jossa saostuma eli saostettu proteiini erotetaan sopivalla menetelmällä, edullisesti mikrosuodattamalla tai sentrifugoimalla, liukoisesta proteiinista. Haluttaessa muunneltuja kokonaisproteiineja erotus jätetään suorittamatta.

Fraktiot pestäään haluttaessa ja konsentroidaan ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai lähellä sitä. Pesulla tarkoitetaan edullisesti diasuodatusta, jossa pestävään liuokseen tai suspensioon lisätään puhdasta vettä ja sekoituksen jälkeen suodatetaan se pois, jolloin pienimolekyyliä yhdisteitä, kuten suoloja ja laktoosia, poistuu suodokseen 5 mukana. Toimenpidettä voidaan jatkaa niin kauan, kunnes saavutetaan haluttu koostumus, proteiini-, laktoosi- ja suolapitoisuus, käsiteltävälle fraktiolle.

Muunteluaste osoittaa avautuneiden disulfidisidosten määrän. Happamissa olosuhteissa pH 1,5-4,5 vapautuvat sulfityysisissä muodostuneet sulfoniryhmät, jolloin 10 avautuneesta disulfidiryhmästä jää jäljelle kaksi sulfhydryliryhmää. Lopputuotteena käytettävä muunnettu kokonaisproteiinikonsentraatti ja proteiinifraktiokonsentraatit tai niistä kuivatut jauheet voivat olla tätä tyypisiä, jolloin vapaita sulfhydryliryhmiä voidaan hyödyntää monella tavalla parantuneina toiminnallisina ominaisuuksina, kuten emulgoituvuutena, geeliytyvyytenä, vaahdotuvuutena ja hydrolysoituvuutena/sulavuutena.

Vapaat sulfhydryliryhmät aiheuttavat helposti sopivissa olosuhteissa disulfidiryhmien avautumista ja syntyneet sulfhydryliryhmät muodostavat toisten sulfhydryliryhmien kanssa uusia disulfidiryhmiä, jolloin muodostuu proteiiniverkkoja, jotka 20 muodostavat suspensiossa emulgoivan proteiinikalvon vesipisaran ympärille tai vaahdossa ilmakuplan ympärille tai sopivan vahvan verkoston geelinmuodostusta varten.

Sulfhydryliryhmät ovat hapetettavissa hapettavalla yhdisteellä edullisesti ilman hapella, dehydroaskorbiinihapolla ja yleensä elintarvikelaatusilla hapettimilla disulfidisidoksiksi edullisesti pH:ssa 4,5-8,5, edullisimmin pH 6,5-7,5, lämpötilassa 45-75 °C, edullisimmin välillä 50-70 °C ja sekoittamalla suspensiota tai liuosta tehokkaasti niin, että disulfididisidokset muodostuvat eri sulfhydryliryhmien kanssa kuin proteiinin alkuperäisessä konformaatiossa. Lopputuote, muunnettu proteiini- tai 30 proteiinifraktiokonsentraatti tai vastaava jauhe on pH:ltaan korkeampi kuin edellä kuvattu tuote, siinä on vähemmän vapaita sulfhydryliryhmiä ja sillä on muuntelun asteesta johtuvia toiminnallisia ominaisuuksia kuten dispergoituvuus, emulgoituvuus, geeliytyvyys ja hydrolysoituvuus/sulavuus.

35 S-sulfoniryhmistä ja sulfiitista vapautunut ja puhalluksessa mahdollisesti poistumatta jäädyn rikkidioksidi muuttuu pH:n noston yhteydessä sulfiitiksi ja hapettuu sulfaatiksi reaktorissa puhallettaessa ilmaa ja sekoitettaessa tehokkaasti pH:ssa 4-7,

edullisesti pH 5-6 ja lämpötilassa 45-65 °C, edullisimmin välillä 50-60 °C. Kyseessä on pienen noin 0,01 %:n sulfiittimääärän hapettuminen sulfaatiksi.

5 Sulfitolyysillä voidaan edellä esitetyn periaatteen mukaan muunnella myös muita proteiineja, kuten soijaproteiineja, esimerkiksi soijaisolaatteja, -konsentraatteja ja -jauhoja, vaikka niiden muuntelu vaatiikin toisenlaiset olosuhteet, jotka ovat riittävät sulfitolyysin tapahtumiselle ja siten disulfidisidosten avautumiselle. Soijaisolaattien muuntelu voidaan suorittaa sulfitolyysillä esimerkiksi seuraavalla tavalla: Soijaisolaatista tehdään 6-10-prosenttinen suspensio veteen. Sulfitolyysissä käytetään sulfiittimäärää 0,02-0,2 M, edullisesti 0,05-0,10 M. Reaktiolämpötila on 60-80 °C, edullisesti välillä 65-75 °C. Sulfitolyysi tapahtuu pH:ssa 5,5-8,0, edullisesti pH:ssa 6,0-7,0. Reaktioaika on 10-50 min edullisesti 20-40 min. Muuntelun jälkeen soijaisolaatti on eristettäväissä ja pestäväissä pH 4,5:ssä, joka on soijaproteiinien isoelektrinen piste. Ylimääräinen sulfiitti poistuu pesuveden mukana sitä täydellisemmin mitä useammin pesu tapahtuu; 2-3 kertaa on riittävä. Sulfiitti on otettavissa talteen pesuväistä alentamalla pH 2:een ja puhaltamalla vapautunut rikkidioksidi vastaanotto-astiaan sulfiitiksi myöhempää käyttöä varten. Tämän jälkeen, kun suurin osa sulfiitista on poistunut, muunnellun soijaisolaatin pH lasketaan 2-3:een, jolloin saostuma liukenee osittain ja sulfitolyysissä muodostuneet S-sulfonaattiryhmät vapautuvat rikkidioksidina näin happamessa ympäristössä. Tarvittaessa rikkidioksidi on puhaltavissa pois tässä vaiheessa. Nostettaessa pH jälleen 4,5:een muodostunut pieni rikkidioksidimäärä muuttuu natriumvetysulfiitiksi ja se on pestäväissä pois.

10 15 20 25

Sulfitolyysin aikaansaamalla soijaisolaatin muuntelulla voidaan inaktivoida biologisesti aktiivisia proteiineja esimerkiksi trypsiini-inhibiittori sekä parantaa proteiinin toiminnallisia ominaisuuksia vapaiden sulfhydryyliryhmien lisääntymistä muuntelusteen osoittamalla määrellä.

30 35

Keksinnön erään suoritusmuodon mukaan heran proteiinien muuntelu, fraktiointi, eristys ja muu käsittely tapahtuu seuraavina jaksoina: Heran proteiinien konsentrointi ultrasuodattamalla, konsentraatin proteiinien rakenteen/konformaation muuntelu sulfitolyysillä, osan muunnelluista proteiineista saostaminen laskemalla pH:ta, happamessa pH:ssa sulfoniryhmistä ja sulfiitista muodostuneen rikkidioksidin puhaltaminen reaktorista sekä talteenotto sulfiittina seuraavaa sulfitolyysiä varten, saostettujen proteiinien erotus liukoisista proteiineista mikrosuodattamalla, saostettujen proteiinien sekä muunnettujen kokonaisproteiinien pesu ja konsentrointi ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai yleensä happamessa pH:ssa, mikrosuodatuksen suodoksen pesu ja konsentrointi ultrasuodattamalla saostus-pH:ssa tai sen yläpuolel-

la, vaihtoehtoisesti, saostettujen proteiinien konsentraatin, muunneltujen kokonaisproteiinien konsentraatin sekä liukoisten proteiinien konsentraatin vapaiden sulphydryyliryhmien hapetus disulfidiryhmiksi uuteen järjestykseen sekä kaikkien proteiinikonsentraattien pesu ja konsentointi ultrasuodattamalla ja lopputuotteiksi saattamisen konsentraatteina tai kuivattuina jauheina.

Heran konsentointi aloitetaan mikrosuodatuksella, jolloin herasta poistetaan mahdolliset kaseiinihiukkaset, ja vähennetään fosfolipoproteiinien ja bakteerien määrää. Mikrosuodatuksen tuloksena ultrasuodatus helpottuu. Saatua mikrosuodatuksen suodosta ultrasuodatetaan 6000-30000 D:n kalvoilla proteiinipitoisuuden väkevöimiseksi alkuperäisestä 0,6 %:sta 16-20-kertaiseksi, joka vastaa 9-12 %:n proteiini-määrää. Edullinen konsentraatin proteiinväkevyys on 10-11 %.

Heraproteiinien rakenteen muuntelu tapahtuu sulfitolyyzin avulla, jolloin haluttu osa disulfididisoksista aukaistaan ja saavutetaan haluttu muunteluaste alkuperäisten disulfididisosten määrään nähden. Heraproteiinien sulfitolyyzi toteutetaan tässä suoritusmuodossa seuraavalla tavalla:

Heraproteiinikonsentraattia, proteiinipitoisuus esimerkiksi 10 %, otetaan tarvittava määrä reaktoriin, jossa on tehokas sekoitus sekä lämpötilan ja pH:n mittaus ja säätö. Konsentraatin lämpötilaksi säädetään 40-65 °C, edullisesti 50-60 °C. Lämpötilan valintaan vaikuttaa mm. haluttu reaktionopeus, käytetyt kemikaalit sekä eristettäville proteiineille halutut toiminnalliset ja muut ominaisuudet. Vakiolämpöiseen proteiinikonsentraattiin lisätään sulfiittia joko NaHSO_3 :na, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$:nä tai Na_2SO_3 :na 0,02-0,2 M, esimerkiksi 0,05-0,1 M, ja sekoitetaan tehokkaasti. Lisättävän sulfiitin määrä riippuu mm. proteiinikonsentraatiosta ja halutusta sulfitolyyysiasteesta. pH säädetään välille 5,5-8, edullisesti välille 6-7, esimerkiksi 6,5. pH:n säädössä käytetään elintarvikelaatuisia hoppoja ja emäksiä, kuten HCl :ää ja NaOH :ta. Reaktioaika, jonka sulfiitti vaikuttaa proteiineihin, on 10-50 min, edullisesti 20-40 min. Aika määrytyy edellä mainittujen tekijöiden yhteisvaikutuksesta halutun muunteluasteen saavuttamiseksi.

Proteiinit, halutun muuntelun jälkeen, saostetaan laskemalla pH 1,5-5,5:een, edullisesti 4,0-5,0:aan. Saostuksessa käytettävä pH riippuu pääasiassa fraktioille halutusta proteiinikoostumuksesta sekä jonkin verran proteiinien muunteluasteesta.

Saostamiseen käytetty aika on 10-40 min, esimerkiksi 20-30 min. Tietyn asteisesti muunnellut proteiinit voidaan jättää saostamatta, kun halutaan muunneltuja koko-

naisproteiineja, ja pH lasketaan suoraan tarpeeksi alas pH 1,5-4,5:een sulfoniryhmi- en ja ylimääräisen sulfiitin vapauttamiseksi rikkidioksidina, joka puhalletaan steri- lillä ilmallä tai ilman ja typen seoksella vastaanottosäiliöön natrium- ja natriumve- tysulfiitin seoksena seuraavaa sulfitolysiä varten.

5

Saostetut proteiinit erotetaan liukoisista proteiineista mikrosuodattamalla. Muodos- tuneet jakeet käsitellään erikseen.

10 Fraktioista proteiineista, saostettu ja liukoinen fraktio, sulfoniryhmät ja ylimää- räinen sulfiitti vapautetaan happamassa pH:ssa rikkidioksidina ja puhalletaan pois reaktioseoksesta, kuten edellä on kuvattu.

15 Muodostuneet jakeet pestään suolojen ja laktoosin vähentämiseksi ja konsentroidaan vaadittuun proteiinipitoisuuteen sekä laktoosi- ja suolapitoisuuteen happamessa pH:ssa, esimerkiksi 4,5:ssä.

20 Haluttaessa jakeen pH nostetaan 5,5-7,5, esimerkiksi 6,5:een, sen läpi puhalletaan steriloitua ilmaa, jolloin vapaana olevat sulfhydryyliryhmät muodostavat disulfidisi- doksia alkuperäisestä poikkeavien kohtiin proteiinimolekyylissä sekoituksen ansios- ta. Käsiteltävä fraktio on pestävissä ja konsentroitavissa ennen pH:n nostoa tai sen jälkeen tai molemmissa vaiheissa.

25 Pestyt, edellä kuvatuilla tavoilla tuotetut konsentraatit saatetaan vaadittuun protei- niipitoisuuteen ja ne ovat käytettävissä jatkosovellutuksiin. Konsentraatit voidaan myös kuivata jauheksi ja käyttää sellaisenaan jatkosovellutuksiin.

30 Sulfitolyyzin kaikilla tärkeillä muuttujilla eli proteiinikonsentraatin proteiinipitoi- suudella, sulfiitin määräällä, reaktiolämpötilalla ja -pH:lla eri vaiheissa sekä eri vai- heissa käytetyillä reaktioajoilla voidaan vaikuttaa eristysprosessin eri osareaktioiden toteutumiseen ja kokonaisuutena koko prosessin lopputulokseen eli eristettävien ja- keiden proteiinien määrään, koostumukseen ja haluttuihin ominaisuuksiin.

Seuraavat esimerkit kuvaavat edellä esitettyä eksintöä.

35 **Esimerkki 1**

Heraproteiinikonsentraatin valmistukseen käytettiin tuorettä edam-juuston valmis- tuksessa syntynytä heraa. Sen proteiinipitoisuus oli 0,6 %, joka on saatu kertomalla

Kjeldahl-menetelmällä määritetty proteiinityppi vakiolla 6,38. Hera mikrosuodatettiin ensin 0,45 μm :n suodatinkalvoilla Millipore Pellicon -laboratoriolaitteistolla. Mikrosuodatuksen suodos konsentroitiin suodattamalla se samalla laitteistolla 10000 D:n ultrasuodatuskalvoilla niin, että konsentraattien proteiinipitoisuudet vaihtelivat 5 8 -12 %:n välillä.

Muuntelua ja fraktointia varten otettiin 0,5 l 8,5-paino/tilavuusprosentista herakonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Se asetettiin lämpötilaltaan säädetävään vesihauteseen ja sen sisältöä sekoitettiin tehokkaalla sekoittimella. Konsentraatin lämpötilaksi 10 säädettiin 45°C.

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ (natriummetabisulfiittia) ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,8:aan lisäämällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla Sorvall RC-5B -sentrifugilla 10000 kierr./min 30 min. Saostuneet proteiinit erottuivat hyvin ja saatu liukoinen osa oli kirkasta. Liukoisesta osasta eli kirkasteesta määritettiin proteiinipitoisuus. Alkuperäisen proteiinikonsentraatin ja kirkasteen proteiinipitoisuksien ero 15 tuksena voitiin laskea, ottamalla huomioon suorituksen aikana tapahtunut laimentuminen, proteiinien jakautuminen saostuneeseen ja liukoiseen osaan kokonaisproteiiniin nähden. Tässä tapauksessa saostuneen proteiinin osuus oli 21 % ja liukaisen 20 vastaavasti 79 %.

25 Esimerkki 2

Muuntelua ja fraktointia varten otettiin 0,5 l 10,5-prosenttista edellä kuvatulla tavalla suodattamalla konsentroitua heraproteiinikonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpötilaksi säädettiin 50 °C ja sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta.

Seosta sekoitettiin edelleen ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 5,3:een lisäämällä seokseen HCl:ää. 35 Saostumaa sisältävää seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin osuus oli 16 % ja liukaisen vastaavasti 84 %.

Esimerkki 3

Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,5 l 10,5-prosenttista edellisessä esimerkis-
 sä käytettyä heraproteiinikonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpöti-
 laksi säädettiin 55 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi suoritettiin lisää-
 mällä proteiinikonsentraattiin 2,4 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan
 lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin koko ajan ja reaktio sai jatkua 30 min. Tä-
 män jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,8:aan lisää-
 mällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävä seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saost-
 tuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin
 osuus oli 26 % ja liukoisena vastaavasti 74 %.

Esimerkki 4

15 Muuntelua ja fraktiointia varten otettiin 0,45 l 9,0-prosenttista heraproteiinikonsent-
 traattia 1,0 l:n lasiastiaan. Heraproteiinikonsentraatti oli laimennettu teollisesti dia-
 suodatuksella tuotetusta 16-prosenttista konsentraatista, joka oli ennen laimentamis-
 ta mikrosuodatettu 0,45 µm:n kalvolla Millipore Prostak -laitteistolla mahdollisten
 kaseinihiukkasten poistamiseksi ja lipoproteiinien vähentämiseksi. Konsentraatin
 20 lämpötilaksi säädettiin 55 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 3,25 g natriummetabi-
 sulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin koko ajan
 ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnelluista proteiineista saostet-
 25 tiin laskemalla pH ensin 5,3:aan ja sen jälkeen 4,8 lisäämällä seokseen HCl:ää. Sa-
 ostumaa sisältävä seosta sekoitettiin pH:n laskun jälkeen vielä 15 min ennen näyt-
 teenottoa. Saostumat erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostu-
 neen proteiinin osuus pH 5,3:ssa oli 39 % ja liukoisena 61 %. Vastaavat luvut pH
 4,8:ssa olivat 46 % ja 54 %.

30 Geelielektroforesimääritykset osoittivat, että pH 5,3:ssa fraktoidussa liukoisessa
 osassa oli vielä vähän BSA:ta (naudan seerumialbumiinia) mukana β -laktoglobulii-
 nin lisänä, mutta pH 4,8:ssa BSA:ta ei enää ollut, vaan β -laktoglobuliinia pelkäs-
 tään.

Esimerkki 5

Muuntelua ja fraktointia varten otettiin 0,5 l 8,57-prosenttista herakonsentraattia 1,0 l:n lasiastiaan. Konsentraatin lämpötilaksi säädettiin 60 °C ja sekoitettiin tehokkaasti. Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 4,8 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktio sai jatkua 30 min. Tämän jälkeen osa muunnellista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,5:een lisäämällä seokseen HCl:ää. Saostumaa sisältävä seosta sekoitettiin vielä 15 min. Saostuma erotettiin sentrifugoimalla 10000 kierr./min. 30 min. Saostuneen proteiinin osuus oli 66 % ja liukoisena vastaavasti 34 %.

Esimerkki 6

15 l:n reaktoriin, jossa oli sekoitus, lämpötilan ja pH:n säätö sekä kaasun puhallusmahdollisuus reaktorin pohjalta, otettiin laboratoriolaitteilla mikrosuodatettua ja ultrasuodatuksella konsentroitua 11,1-prosenttista heraproteiinikonsentraattia 9,0 l heraproteiinin muuntelua varten. Konsentraatin lämpötila säädettiin 55 °C:een ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.

20 Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 63 g natriummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan lisäämällä NaOH:ta. Seosta sekoitettiin ja reaktion annettiin jatkua 30 min. Tämän jälkeen muunnellun proteiinikonsentraatin pH laskettiin lisäämällä HCl:ää ja sekoittaen 2,0:aan, jossa sulfiitista suurin osa on tasapainoreaktion osana rikkidioksidina sekä muunteluasteen osoittamiin määriin disulfidisidoksia muodostuneet S-sulfonaattiryhmät ovat vapautuneet myös rikkidioksidina. Sekoitusta jatkettiin 15 min. Rikkidioksidin poistamiseksi puhallettiin reaktoriin steriloitua ilmaa 3 l/min noin tunnin ajan samalla sekoittaen tehokkaasti, jolloin rikkidioksiidi poistui puhalletun ilman ja vesihöyryyn mukana. Rikkidioksidipitoisen ilma otettiin vastaanottoastiaan, jossa se pH 7,0:ssa liuotettiin veteen ja neuraloitui natrium- ja natriumvetysulfiitin seokseksi. Tämän jälkeen muunnellun proteiinikonsentraatin pH nostetaan 5,0:aan ja mahdollisesti rikkidioksidin poistopuhalluksen jälkeenkin jäänyt pieni sulfiittimäärä hapetettiin sulfaatiksi puhaltamalla steriliä ilmaa reaktoriin edellä kuvatulla tavalla ja samalla sekoittaen noin 30 min ajan.

35 Tämän jälkeen muunnettua proteiinikonsentraatti pestiin diasuodattamalla 10000 D -ultrasuodatuskalvoilla kolme kertaa omalla tilavuudellaan vettä, jolloin laktoosin ja suolojen määrä väheni yhteen kolmasosaan. Saatu muunnettua proteiinikonsentraatti on koostumukseltaan alkuperäisen kaltainen, mutta sen toiminnalliset ominaisuudet

ovat muuttuneet, mm. sen pепсиини hydrolysoituvuus (hydrolyysinopeus) on alkuperäiseen konsentraattiin nähdien 2,2-kertainen kolmen tunnin aikana

Esimerkki 7

5

Esimerkissä 4 mainittua 9,0-prosenttista heraproteiinikonsentraattia otettiin esimerkissä 6 mainittuun reaktoriin 7,0 l muuntelua ja fraktiointia varten. Konsentraatin lämpötila säädettiin 55°:een ja sekoitettiin tehokkaasti.

10 Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä proteiinikonsentraattiin 32 g sodiummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,0:aan NaOH:lla. Seosta sekoitettiin ja reaktion annettiin edetä 30 min. Tämän jälkeen osa proteiinikonsentraatin muunnelluista proteiineista saostettiin laskemalla pH 4,5:een HCl:llä. Saostumaa sisältävä seosta sekoitettiin vielä 15 min saostuneen ja liukoisien proteiinien määrän tasapainottumiseksi. Saostuneet proteiinit erotettiin saostuksen jälkeen suodattamalla 0,45 μ m:n mikrosuodatuskalvoilla ja pestiin kerran omalla tilavuudellaan vettä. Suodos otettiin talteen ja käytettiin mikrosuodatuksen suodokseen eli liukoisien osan ensimmäisenä pesuvetenä.

15

20 Saostuman pH laskettiin HCl:llä 2,0:aan ja vapautunut rikkidioksidi puhallettiin pois ja sen jälkeen pH nostettiin 5,0:aan ja puhallettiin uudelleen pienen sulfiittijäämän hapettamiseksi sulfaatiksi, kuten esimerkissä 6 on kuvattu. Lopuksi tämä fraktio pestiin ultrasuodattamalla laktoosin ja suolojen vähentämiseksi sekä konsentroitiin 10 %:n proteiinipitoisuuteen.

25 Liukoisesta osasta poistettiin sulfiitti- ja S-sulfoniryhmät kuten edellä tehtiin saostuneen osan kohdalla. Sen jälkeen pH nostettiin 4,5:een ja pestiin ultrasuodattamalla ensin mikrosuodatuksen pesuvedellä ja sitten kaksi kertaa vedellä ja konsentroitiin 15 %:n proteiinipitoisuuteen.

30 **Esimerkki 8**

Soijaproteiinin muuntelua varten sekoitettiin 70 g isolaattia 1,0 l:aan vettä 2 l:n lasiastiassa. Soijaisolaatin proteiinipitoisuus oli noin 85 %. Suspension lämpötilaksi säädettiin 70 °C ja sitä sekoitettiin tehokkaasti.

35

Sulfitolyysi käynnistettiin lisäämällä isolaattisuspensioon 9,5 g sodiummetabisulfiittia ja pH säädettiin 6,5:een NaOH:lla. Reaktioaika oli 30 min ja koko ajan suspensiota sekoitettiin tehokkaasti.

Muuntelun jälkeen suspension pH laskettiin 4,5:een, jolloin soijan proteiinit saostuvat. Saostuma sentrifugoitiin 10000 k ierr./min. 30 min, jolloin proteiinisaostuma jää putken pohjalle ja kirkkaaseen vesikerrokseen, kirkasteesseen jäivät suolat mm. sulfiitti sekä vähän proteiinia (noin 0,5 %). Kahden pesukerran jälkeen suolojen 5 määrä pieneni olennaisesti, mutta näissä pesuvesissä proteiinia oli vain nimaksi. Pesujen jälkeen pH laskettiin 2,5:een ja pidettiin siellä 15 min samalla sekoittaen.

pH nostettiin uudelleen 4,5:een, jossa saostuma pestiin vielä kerran ja alkuperäiseen konsentraatioon liuotetun proteiinin pH nostettiin 6,0:aan. Tämä oli loppuutote, 10 josta tehtiin trypsiini-inhibiittorin aktiivisuuden määritys sekä geelielektroforeesimääritys proteiinin molekyylikoon jakautumisesta. Trypsiini-inhibiittorin aktiivisuus määritettiin menetelmällä, joka on esitetty julkaisussa Kakade, M. L., Rackis, J. J., McGhee, J. E. ja Puski, G., Cereal Chem. 51 (1974), 376-382.

15 Määritystulosten mukaan muunnettua soijaisolaattiproteiini oli menettänyt kokonaan trypsiini-inhibiittoriaktiivisuutensa, mutta vertailuna käytetyssä alkuperäisessä isolaattiproteiinissa aktiivisuutta oli menetelmässä käytetyn laimennussarjan väkevimmässä ja toiseksi väkevimmässä näytteessä selvästi ja kolmannessa havaittavasti. Geelielektroforeesimääritys osoitti vertailtaessa alkuperäisen soijaisolaatin ja muunnenlun isolaatin proteiinimolekyylien jakautumaa, että muunnellussa isolaatissa molekyylipainoltaan pienempien proteiinien eli isompien proteiinien osaproteiinien määrä oli selvästi lisääntynyt.

20 Edellä on esitetty eräitä keksinnön sovelluksia. Keksintöä luonnollisesti ei rajoiteta edellä esitettyihin esimerkkeihin, vaan keksinnön mukaista periaatetta voidaan muunnella patenttivaatimusten suoja-alan puitteissa.

Patenttivaatimukset

1. Menetelmä proteiinin, erityisesti hera- tai soijaproteiinien, muuntemiseksi ja eristämiseksi, **tunnettua** siitä, että
 - 5 a) saatetaan proteiini, kuten hera tai soija tai sen konsentraatti, kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi, ja valinnaisesti
 - b) saostetaan sulfonoitu proteiini happamassa pH:ssa, ja
 - c) otetaan sulfonoitu proteiini tai saostunut ja/tai liukoinen sulfonoitu proteiini talteen ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely.
- 10 2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettua** siitä, että hera tai sen konsentraatti saatetaan kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi lämpötilassa 40-65 °C, edullisesti 50-60 °C.
- 15 3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, **tunnettua** siitä, että herakonsentraatin proteiinipitoisuus on 9-12 paino-%.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettua** siitä, että soija tai sen konsentraatti saatetaan kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa 20 proteiinin sulfonoimiseksi lämpötilassa 60-80 °C, edullisesti 65-75 °C.
5. Patenttivaatimuksen 1, 2, 3 tai 4 mukainen menetelmä, **tunnettua** siitä, että kohdassa (a) pH säädetään arvoon 5,5-8, edullisesti 6-7.
- 25 6. Jonkin patenttivaatimuksen 1-5 mukainen menetelmä, **tunnettua** siitä, että kohdan (a) sulfonoinnissa käytetään sulfiittia 0,02-0,20 M, edullisesti 0,05-0,10 M.
7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettua** siitä, että proteiinin sulfonoitumisasteesseen vaikutetaan reaktio-olosuhteita ja reagenssien määrää muuttamalla.
- 30 8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, **tunnettua** siitä, että sulfonoidut proteiinit saostetaan koostumukseltaan erilaisina fraktioina pH-arvoa säätelemällä.
- 35 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, **tunnettua** siitä, että sulfonoidut proteiinit saostetaan laskemalla pH arvoon 1,5-5,5, edullisesti arvoon 4,0-5,0.

10. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että sulfonoiduista proteiineista tai saostuneesta ja/tai liukoisesta sulfonoidusta proteiinista poistetaan sulfoniryhmät sekä samasta liuoksesta sulfiitit laskemalla pH noin 1,5-4:ään, jolloin molemmat vapautuvat rikkidioksidina ja proteiiniin muodostuu vapaita sulfhydryyli-
5 ryhmiä.

11. Patenttivaatimuksen 1 tai 10 mukainen menetelmä, tunnettu siitä jäljelle jäänyt sulfiitti hapetetaan sulfaatiksi puhaltamalla ilmaa seokseen pH:ssa 4-7.

10 12. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, tunnettu siitä, että vapaista sulfhydryyliryhmistä muodostetaan uudelleen disulfidiryhmiä puhaltamalla ilmaa proteiiniseokseen, jonka pH on 4,5-8,5 ja lämpötila 45-75 °C.

(57) Tiivistelmä

Keksintö koskee menetelmää proteiinien eristämiseksi herasta tai soijasta ja eristettyjen proteiinien muuntemiseksi, jossa menetelmässä

- a) saatetaan hera tai soija tai sen konsentraatti kosketuksiin sulfiitti-ioneja muodostavan reagenssin kanssa proteiinin sulfonoimiseksi, ja valinnaisesti
- b) saostetaan sulfonitoi proteiini happamassa pH:ssa, ja
- c) otetaan sulfonitoi proteiini tai saostunut ja liukoinen sulfonitoi proteiini talteen ja suoritetaan sille mahdollinen jälkikäsittely.

